

ممانعت از اتصال فاگوزوم - لیزوزوم توسط لژیونلا پنوموفیلا در داخل آمیب آزاد

سیدرضا حسینی دوست Ph.D.*، اشرف محبتی مبارز M.Sc.*

* دانشگاه بقیه‌اله، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتریولوژی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۶۷۷۷-۱۱۳۶۵، دانشگاه بقیه‌اله، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

چکیده

✪ **هدف:** عدم توفیق عملیات مرسوم تصفیه آب برای ریشه‌کنی عامل بیماری لژیونر توجه بسیاری از میکروبیولوژیست‌ها را به خود جلب کرده است. در این مقاله نحوه مقاومت این باکتری در مقابل مکانیسمهای باکتریساید داخل آمیب میزبان بیان شده است.

✪ **مواد و روشها:** در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای فلورسنت، لیزوزومهای آکانتامبا نشاندار شد و پس از انجام فاگوسیتوز، نحوه مقاومت باکتریهای داخل سلولی بررسی گردید. لیزوزومهای آکانتامبا کاستلانی به وسیله آکریدین اورنج که یک ماده فلوروسنت است نشاندار و سپس اتصال یا عدم اتصال آنها با فاگوزومهای همان سلول از روی تغییر رنگ تعیین شد.

✪ **یافته‌ها:** نتیجه این تحقیق نشان داد که لژیونلا پنوموفیلا وقتی توسط آمیب بلعیده و در داخل واکوتول هضمی آن (فاگوزوم) قرار گرفت، از اتصال لیزوزومهای میزبان به فاگوزوم ممانعت کرده و به این طریق موجبات ادامه زندگی خود را در سلول میزبان فراهم می‌کند. درحالی‌که ایشرشیاکلی که معمولاً غذای این آمیب را تشکیل می‌دهد قادر به این ممانعت نیست.

✪ **نتیجه‌گیری:** آمیبهای آزاد به‌طور فعال باکتریهای موجود در طبیعت را فاگوسیت و هضم کرده و از این طریق در ایجاد تعادل بیولوژیک طبیعت مشارکت می‌نماید. بعضی از باکتریها مثل لژیونلا پس از بلع توسط آمیب، این چرخه را به نفع خود تغییر داده و علاوه بر رشد درون سلولی موجب مرگ سلول میزبان می‌شوند. این که چگونه باکتریها می‌توانند بر آنزیمهای هضمی سلول میزبان قائل آیند تاکنون در مورد آمیبهای آزادی پاسخ مانده است. این مطالعه نشان می‌دهد که لژیونلا پنوموفیلا با ممانعت از اتصال لیزوزومهای آمیب به فاگوزومی که در آن گرفتار شده به زندگی خود ادامه می‌دهد. این واقعیت احتمالاً دلیل عدم کارایی روشهای متعارف ضدعفونی آب و در نتیجه ریشه‌کنی لژیونلا از محیط زیست را بیان می‌کند.

کل واژگان: لژیونلا پنوموفیلا، آکانتامبا کاستلانی، آکریدین اورنج، اتصال فاگو - لیزوزوم

در داخل بافر فسفات تهیه و به کمک فیلتر (به اندازه ۰/۲ میکرومتر) استریل و در یخچال معمولی نگهداری شد. محلول آکریدین اورنج در موقع استفاده به غلظت نهایی ۵ میکروگرم در میلی لیتر رسانده شد. آزمایشهای انجام شده بی ضرر بودن این میزان آکریدین اورنج را برای آمیب تأیید کردند.

قبل از آزمایش، آکانتامبا کاستلانی در داخل فلاسکهای یکبار مصرف کشت سلولی محتوی محیط PYG که حاوی پروتون پپتون، عصاره مخمر و گلوکز است (۱۵)، کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ سانتی گراد نگهداری شد تا یک لایه سلولی در کف فلاسک تشکیل گردد. *L. pneumophila* روی محیط اختصاصی BCYE که محتوی بافر، چارکول، عصاره مخمر، ال سیستین و فریک پیروفسفات است (۱۶)، کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ سانتی گراد نگهداری شد و باکتری *E. coli* روی محیط لوربل آگار، کشت و در یخچال معمولی نگهداری شد.

برای آزمایش فاگوستوز، ابتدا لیزوزومهای آکانتامبا با آکریدین اورنج و مطابق روشهای قبل (۱۴) با اندکی تغییرات نشاندار شد. به این منظور، از لاملهای مدور میکروسکوپی به قطر ۲۰ میلی متر استفاده شد. این لاملها در ابتدا به وسیله اتانول ۹۰ درصد و آب مقطر تمیز و شسته شده و با شعله چراغ الکلی استریل شدند. آکانتامبا از داخل فلاسک جمع آوری شده و دومرته با بافر مخصوص آمیب (۱۳) شستشو داده شدند و در نهایت تعداد آنها حدود ۱۰^۶ سلول در هر میلی لیتر بافر تعیین گردید. میزان آمیبهای زنده به وسیله رنگ تریپان بلو تعیین شد که در این مرحله بیش از ۹۵ درصد بود. مقدار صد میکرولیتر سوسپانسیون آمیب روی هر لامل قرار گرفت و پس از آن لاملها به مدت یک ساعت در دمای ۳۰ سانتی گراد قرار داده شدند تا آکانتامباها فرصت یابند خود را به سطح لامل بچسبانند. در این موقع مایع اضافی به آرامی جمع آوری و سلولهای موجود روی لاملها با بافر شسته شدند. بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر محلول آکریدین اورنج (۵ میکروگرم در میلی لیتر) روی هر لامل ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ سانتی گراد قرار داده شدند. پس از آن محلول آکریدین اورنج از روی سطح لاملها جمع آوری و لاملها با بافر شستشو داده شده و در نهایت به مدت ۳۰ دقیقه دیگر در داخل محیط PYG قرار گرفتند تا آکریدین اورنج موجود در سطح سلولها جذب شده و به خوبی لیزوزومهای آن را نشاندار کند. پس از این مرحله یکبار دیگر لاملها با بافر شسته و بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون محتوی ۱۰^۷ در میلی لیتر از *E. coli* یا *L. pneumophila* بر روی آکانتامباهای موجود روی لامل منتقل و سپس کلیه لاملها به منظور ایجاد تماس نزدیکتر بین باکتری و سطح آمیب به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰×g و در دمای ۴ سانتی گراد سانتریفوژ (Beckman) شدند. به این منظور کلیه لاملها در کف حفره های پلیتهای ۴۸ حفره ای قرار گرفته و سپس این پلیتها با استفاده از هد مخصوص سانتریفوژ شدند. پس از اتمام سانتریفوژ، مایع اضافی از روی لاملها جمع آوری و هر کدام از آنها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر نیم گرم شسته شدند. کلیه لاملها سپس در داخل حفره های پلیت کشت سلولی قرار گرفته و بعد از اینکه حدود یک میلی لیتر بافر روی سطح هر

مقدمه

لژیونلوز عفونت‌هایی هستند که توسط استرین‌های مختلف لژیونلا در انسان ایجاد می‌شود. لژیونلوز معمولاً به دو صورت بروز می‌نماید: یکی بیماری لژیونر که یک پنومونی کشنده غیر تبییک است و دیگری تب پونتیاک (۱). کشف این باکتری از نظر تاریخی به همه گیری مشهور پنومی سال ۱۹۷۶ در شهر فیلادلفیای آمریکا برمی‌گردد که طی آن ۲۴ نفر به هلاکت رسیدند (۲). لژیونلا پنوموفیلا عامل اصلی بیماری لژیونر بوده و شیوع آن از بیشتر نقاط جهان گزارش شده است. این باکتری به طور طبیعی در مخازن آبهای محیطی و لوله کشی آب شهری (۳) زندگی می‌کند و از این طریق تجهیزات خنک کننده شهری را آلوده کرده و به انسان منتقل می‌شود (۴). لژیونلا یک باکتری گرم منفی داخل سلولی است که می‌تواند به صورت اختیاری منوسیتها، ماکروفاژها (۵) و طیف وسیعی از تک باخته‌های آزاد (۶) مثل آکانتامباها (۷) را آلوده کرده و درون آنها تکثیر کند. در بیشتر تحقیقاتی که پیرامون اپیدمیولوژی این بیماری انجام شده، لژیونلا و آمیبهای آزاد به طور توأم از نمونه‌ها جدا شده است (۸). وجود این ارتباط تنگاتنگ بین دو میکروارگانیسم باعث شده که از همان ابتدا آمیبهای آزاد را به عنوان مخزن (۹) و به عبارتی جان‌پناه لژیونلا به حساب آورند. علاوه بر لژیونلا، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای دیگر مثل برخی از پلاسمودیومها، تریانوزوم کروز، شیگلا فلکسنری، ریکتزیاها و کلامیدیاها نیز بعضی به صورت اختیاری و بعضی به صورت اجباری زندگی داخل سلولی دارند (۱۰). میکروارگانیسم‌های داخلی سلولی مکانیسم‌های متفاوتی را برای این منظور به کار می‌گیرند. برخی مثل تریانوزوم کروز از فاگوزوم می‌گیرند، بعضی دیگر مثل لیشمانیا در مقابل آنتی‌بیم‌های لیزوزومی مقاومت می‌کنند و بالاخره گروهی همچون مایکوباکتریوم توبریکولوزیس و کلامیدیا از اتصال فاگوزوم و لیزوزوم ممانعت می‌کنند (۱۰). لژیونلا پنوموفیلا نیز از طریق مسامتت از اتصال فاگو - لیزوزوم به زندگی خود در داخل ماکروفاژهای انسانی ادامه می‌دهد (۱۱). علیرغم توانایی این باکتری در زندگی و تکثیر درون آمیبها، هنوز مکانیسم‌های موجود در این خصوص به خوبی تشریح نشده‌اند. این تحقیق به منظور فراهم آوردن اطلاعات بیشتر در مورد زندگی داخل سلولی لژیونلا و هموار نمودن مسیر ریشه‌کنی بیماری لژیونر طراحی و انجام یافته است.

مواد و روشها

استرین بیماری‌زای لژیونلا پنوموفیلا که در ابتدا از سیستم آب بیمارستان جدا شده بود (۱۲) و روی گلوله‌های شیشه‌ای به حالت منجمد در آزمایشگاه نگهداری شد. آکانتامبا کاستلانی نیز از چشم یک بیمار مبتلا به کراتیت آمیبی جدا شد (۱۳). آکانتامبا روی محیط آگار معمولی و همراه با ایشرشیاکلی کشته شده رشد داده شد و این کشته در داخل پاکتهای پلاستیکی درب بسته درون یخچال معمولی تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

آکریدین اورنج (AO) از شرکت سیگما خریداری شد و در آزمایشگاه یک محلول ذخیره به غلظت صد میکروگرم در هر میلی لیتر

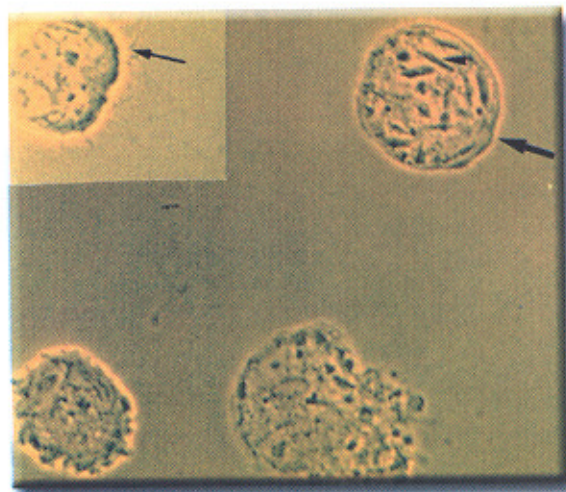
توجیه نمود که در دماهای پایین (۲۰° و ۳۰° سانتی‌گراد) تنها آمیب فعال بوده ولی هرچه دما افزایش یافته (۳۷° سانتی‌گراد) بر فعالیت باکتری نیز افزوده شده است. از سوی دیگر، در این میان چون قدرت هجوم لژیونلا (بیماری‌زا) بیش از کلیفرم بوده، احتمالاً فعالیت خود باکتری نیز در افزایش اندکس فاگوسیتوز نقش داشته است. به‌منظور مشاهده فعالیت ریزه‌خواری آکانتامبا در مواجهه با ذرات غیربیولوژیک از ذرات لاتکس نشاندار شده با ماده ایزوتیوسیانات استفاده شد (شکل ۲-۸). چنانچه اندکس فعالیت فاگوسیتوز در آکانتامبا کاستلانی نشان می‌دهد (جدول ۱)، قدرت ریزه‌خواری آمیب، وقتی که *L. pneumophila* در دسترس بوده نسبت به زمانی که *E. coli* در اختیارش بوده افزایش یافته است (شکل ۲-۸ و ۲-۹).

جدول ۱: اندکس اتصال فاگوزوم - لیزوزوم (FI) و فاگوسیتوز (PI) در آکانتامبا کاستلانی در حین فعالیت فاگوسیتوز

	Fusion Index (FI)				Phagocytosis Index (PI)			
	<i>L. pneumophila</i>		<i>E. coli</i>		<i>L. pneumophila</i>		<i>E. coli</i>	
	Mean	S.E.M	Mean	S.E.M	Mean	S.E.M	Mean	S.E.M
۲۲ °C	۸/۲	۲/۸	۱۶/۲	۵/۹	۱۲/۲	۷/۲	۲/۷	۰/۸
۲۰ °C	۲/۲	۲/۶	۱۷/۸	۲/۹	۱۸/۹	۲/۷	۱۰/۲	۲/۰
۳۷ °C	۲۸/۲	۷/۲	۱۵/۲	۱۷/۲	۱۲/۲	۸/۵	۱۲/۴	۱۲/۷

مقایسه اندکسهای اتصال در دماهای مختلف نشان می‌دهد که اولاً این اندکس در آمیبهایی که محتوی *L. pneumophila* بودند در مقایسه با آمیبهای محتوی *E. coli* کمتر است. به همین ترتیب اندکس مذکور، در دمای ۳۰° سانتی‌گراد بیشتر از ۲۰° سانتی‌گراد، و در ۳۷° بیشتر از ۳۰° سانتی‌گراد است. به بیان دیگر، باکتری در دمای ۳۷° سانتی‌گراد بیشتر توانسته از اتصال فاگو - لیزوزوم ممانعت کند و به همین ترتیب در دماهای پایین‌تر قدرت باکتری‌کشی آمیب ملموس‌تر است. لیزوزومهای نشاندار شده آکانتامبا را با آکریدین اورنج در شکل ۳ مشاهده می‌کنیم. تغییر رنگ این لیزوزومها مربوط به pHهای متفاوت داخل آنها است که خود بیانگر اتصال یا عدم اتصالشان به فاگوزوم است. همچنین آمیبهایی که در جریان خشک شدن و مواجهه با اشعه اولترابوله کشته شده‌اند، به رنگ زرد یکنواخت در همین تصویر دیده می‌شوند. در شکل ۲-۸ لژیونلاهای داخل سلولی را به رنگ سبز کم‌رنگ مشاهده می‌کنیم که دلیل بر ممانعت آنها از اتصال فاگو - لیزوزوم آمیب می‌باشد. در مقابل باکتری ایشرشیاکلی به‌صورت میله‌های کوچک قرمز رنگ در داخل فاگوزوم آمیب دیده می‌شوند (شکل ۲-۹). این رنگ باکتری در داخل سلول میزبان، دلیلی است بر اینکه فاگوزومی که آن را احاطه کرده به لیزوزومهای سلول متصل شده است.

کدام ریخته شد، به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۰°، ۳۰° و ۳۷° سانتی‌گراد قرار داده شدند تا فاگوسیتوز انجام گیرد. در پایان بافر از روی لامل‌ها جمع‌آوری و بک بار نیز با بافر نیمه گرم شستشو داده شدند. در این موقع کلیه لامل‌ها در جریان هوای آزمایشگاه قرار داده شدند تا خشک شوند. پس از کشتن باکتریهای موجود در سطح آنها به کمک اشعه اولترابوله، بر روی لامل‌های میکروسکوپی قرار گرفته و بلافاصله با میکروسکوپ فلورسنت زایس مجهز به لامپ جیوه‌ای و فیلترهای مخصوص آزمایش شدند. در هر لام حداقل ۱۰ میدان میکروسکوپی آزمایش و در مجموع بیش از ۱۰۰ باکتری داخل سلولی شمارش گردید. باکتریهایی که به رنگ نارنجی پر رنگ متمایل به قرمز بودند به‌عنوان نمونه مثبت (اتصال لیزوزوم به فاگوزوم) و باکتریهایی که دارای رنگ زرد کم‌رنگ متمایل به سبز بودند به‌عنوان نمونه منفی شمارش شدند. به موازات آزمایش اصلی و به‌منظور بررسی فعالیت بیگانه‌خواری در آکانتامبا، بدون آنکه آمیب نشاندار شود به همان نحو با لژیونلا و ایشرشیاکلی مجاور شدند. پس از پایان زمان تماس لامل‌های حامل میکروارگانیسمها ثابت شده و با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری ارگانیسمهای فاگوسیت شده شمارش شدند (شکل ۱).



شکل ۱: این تصویر لژیونلا پنوموفیلا فاگوسیت شده توسط آکانتامبا کاستلانی را با میکروسکوپ فاز کنتراست نشان می‌دهد. پیکان بزرگ نمایانگر تروفوزوئیت آمیب و پیکان کوچک نشان‌دهنده لژیونلاها در داخل آمیب است (بزرگنمایی ۱۰۰۰×).

اندکس اتصال فاگوزوم به لیزوزوم (FI) در هر نمونه از طریق ضرب نمودن موارد مثبت هر نمونه در تعداد متوسط فاگوزومهای متصل شده در همان نمونه محاسبه شد. اندکس فاگوسیتوز (PI) نیز با ضرب کردن درصد تعداد باکتریهای فاگوسیت شده در تعداد متوسط باکتری در هر سلول و در نمونه موردنظر به‌دست آمد (۲۳).

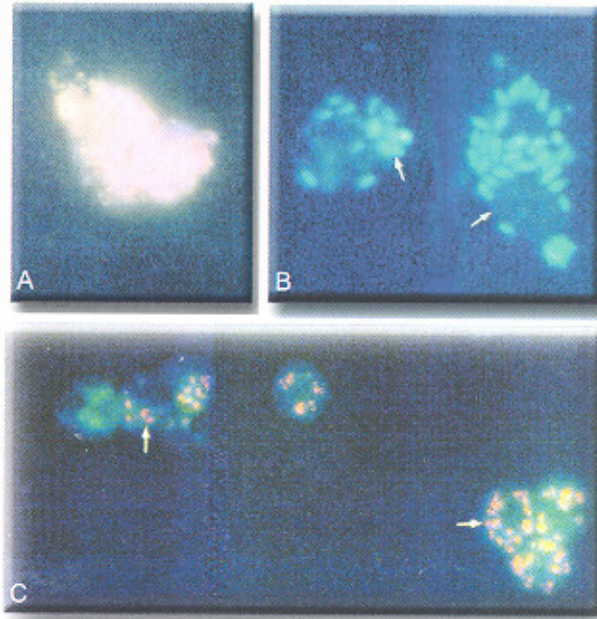
یافته‌ها

به‌طور کلی به موازات افزایش دما، بر فعالیت ریزه‌خواری آمیب نیز افزوده شده است (جدول ۱). این امر را می‌توان به این صورت

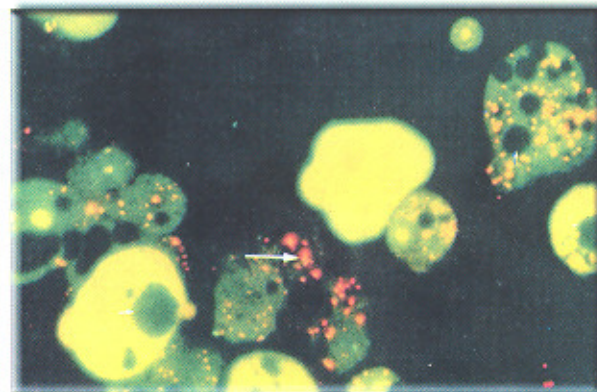
1. Fusion Index
2. Phagocytosis Index

بحث

بعضی از میکروارگانیسم‌های داخل سلولی مثل مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، کلامیدیا پسی تاسی و انسفالیتوزوم کونیکولی پس از بلعیده شدن توسط ماکروفاژهای پستانداران مانع از اتصال لیزوزومها به فاگوزوم سلول شده و از این طریق بر مکانیسم‌های ضدحیات داخل سلول میزبان فائق می‌آیند (۱۱، ۱۷). لژیونلا پنوموفیلا که یک باکتری داخل سلولی اختیاری است از طریق مسامتت از اتصال فاگوزوم بر ماکروفاژها و منوسینهای انسانی چیره می‌شود (۱۱) و در این مطالعه معلوم شد که باکتری موردنظر همین مکانیسم را برای تکثیر در داخل آکانتامبا به کار می‌برد و شاید بتوان مسامتت از اتصال فاگو-لیزوزوم را حداقل یکی از تاکتیکهای زندگی داخل سلولی لژیونلا در داخل تک‌یاخته‌های محیط زیست قلمداد کرد. فاگوسیتوز در میان تک‌یاخته‌های آزاد به‌عنوان یک فرآیند طبیعی و بیشتر به‌منظور تغذیه و تأمین انرژی انجام می‌شود ولی در عین حال مکانیسم‌های دفاعی و باکتری‌کشی این پدیده در میان این گروه از میکروارگانیسم‌ها قوی و قابل توجه است (۱۸). با این وجود بعضی از باکتریها به خوبی خود را با شرایط داخل سلولی وفق داده و به زندگی ادامه می‌دهند. زندگی داخل آمیبی نیز آثار زیادی بر روی لژیونلا باقی می‌گذارد از جمله اینکه باکتری متعاقب زندگی داخل سلولی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد کرده (۱۹) یا قدرت بیماری‌زایی آن افزایش می‌یابد (۲۰). همچنین لژیونلاهای داخل سلولی (در آمیب) روی محیط کشت رشد نمی‌کنند و مشکلاتی را در تشخیص به‌وجود می‌آورند (۲۱) و تنها با استفاده از روشهای PCR و DNA پروب می‌توان به وجودشان پی برد (۲۲). تاکنون چندین روش برای اتصال فاگوزوم-لیزوزوم پیشنهاد شده است که می‌توان به کاربرد میکروسکوپ الکترونی در ردیابی بعضی از نشانگرهای لیزوزومی مثل اسیدفسفاتاز در واکوئل‌های سلول میزبان اشاره کرد. ولی ردیابی لیزوزومها با استفاده از نشانگرهای فلورسنت، کاربرد وسیعتری پیدا کرده است (۲۳). در این مطالعه از آکریدین اورنج که یک نشانگر فلورسنت لیزوزوم بوده و نسبت به تغییر داخل سلولی حساسیت خوبی دارد (۲۴)، با اِعمال برخی تغییرات استفاده شده است. به‌طور کلی اندکس فاگوسیتوز آکانتامبا نسبت *L. pneumophila* و *E. coli* تقریباً شبیه و در هر دو نسبتاً بالاست. در مورد کلیفم تقریباً مقاومت و مسامتت زیادی در مقابل اتصال فاگو-لیزوزوم صورت نگرفت و شاید به همین دلیل باکتری پس از مدت کمی در داخل واکوئل آمیب از بین رفته است. یافته‌های آزمایشگاهی نیز این واقعیت را تأیید می‌نمایند؛ چراکه *E. coli* در آزمایشگاه طعمه غذایی دلخواه آکانتامبا را تشکیل می‌دهد ولی در مورد *L. pneumophila* این‌طور نبوده و باکتریهای فاگوسیت شده تا مدت‌ها پس از بلعیده شدن (در شرایط آزمایشگاهی) در بدن آمیب زنده می‌ماند.



شکل ۲: این تصویر، ذرات لاتکس نشاندار شده با فلورسنتین را پس از آنکه توسط آمیب فاگوسیت شدند به رنگ سفید درخشنده در زمینه آبی نشان می‌دهد (بزرگنمایی $\times 400$). A: *L. pneumophila* در داخل فاگوسیت آمیبی که قبلاً با آکریدین اورنج نشاندار شده است به‌صورت پسیل‌های با رنگ زرد مایل به سبز در زمینه آبی شارپ دیده می‌شوند و پیکانها باکتریهای داخل سلولی را مشخص کرده‌اند (بزرگنمایی $\times 400$). C: *E. coli* در داخل فاگوسیت آمیبی که قبلاً با آکریدین اورنج نشاندار شده است به‌صورت اجسامی به‌رنگ مخیکی در زمینه آبی رنگ دیده می‌شوند (بزرگنمایی $\times 130$).



شکل ۳: تروفوزونینهای آکانتامبا کاستلانی که با آکریدین اورنج نشاندار شده‌اند، لیزوزومهای آمیب به‌صورت عناصر مدور و به رنگ قرمز پررنگ دیده می‌شوند. پس از اتصال به فاگوزوم، به رنگ زرد متعادل به نارنجی درمی‌آیند. پیکان بزرگ لیزوزومهای نشاندار شده آمیب و پیکان کوچک واکوئل انقباضی آمیب را نشان می‌دهد (بزرگنمایی $\times 680$).

References

- Victor Y: Legionella pneumophila. In principles and practice of infection disease, Mandell M, Bannett Y, Dolin R (eds). London, Churchill Livingstone, 1995, pp 2087-2093
- McDade EJ: Legionellaes' disease, isolation of bacterium and demonstration of its role in other



2. McDade EJ: Legionella's disease, isolation of bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New Engl J Med* 1977; 297: 1197-1203
3. Paszko-Kolva C, Shahamat M, Colwell R: Long-term survival of *L. pneumophila* serogroup 1 under low-nutrient conditions and associated morphological changes. *FEMS Microb Eco* 1992; 102: 45-55
4. Blatt P, Dolani J, Hendrix W, Melcher P: Legionnaires' disease in human immunodeficiency virus infected patients. *Clin Infect Dis* 1994; 18(2): 227-232
5. Dowling J, Saha A, Glew R: Virulence factors of the family Legionellaceae. *Microbiology Review* 1992; 56(1): 32-60
6. Henk M, Seidel M: Association between *L. pneumophila* and Amoeba in water. *Israel J Med* 1986; 22: 690-695
7. Rodriguez S: Ecology of free-living amoebae. *Critical Review Microbiology* 1994; 20(3): 225-241
8. Rowbotham T: Preliminary report on the pathogenicity of *L. pneumophila* for fresh-water and soil amoebae. *J Clin Path* 1980; 33: 1129-1183
9. Housong D, Colwell R, O'Brein M, Weiss E, Pearson A, Weinner R, Burge W: Viable *L. pneumophila* not detectable by culture on agar media. *Biotechnology* 1987; 5: 947-950
10. Moulder J: Comparative Biology of intracellular parasitism. *Microbiological Reviews* 1985; 94(3): 298-337
11. Horwitz M: The legionnaires' disease bacterium (*L. pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* 1983; 158: 2108-2126
12. patterson W, Seal D, Curran E, Siclare T, Mc Luckei J: Fatal nosocomial legionnaires' disease: Relavance of contamination of hospital water supply by temperature dependent buoyancy-derived flow from spur pipes. *Epidemiology & Infections* 1994; 112: 513-525
13. Hay J, Kirkness C, Seal D, Wright P: Drug resistance and *Acanthamoeba* keratitis, the quest for alternative anti protozoa chemotherapy. *Eye* 1994; 8: 555-563
14. Taylor M, Espinosa M, Iturbe R, Rico B, Casasola J, Goodsaid F: Evaluation of phagolysosome fusion in acridine orange stained macrophages infected with *histoplasma capsulatum*. *Clin Exp Immun* 1989; 75: 466-470
15. Page F: A new key to fresh water and soil gymnamoebae with instructions for culture. Ambleside Uk: Fresh water Biological Association. The Ferry House, 1988, pp 16-19
16. Harrison T, Tylor A: A laboratory manual for legionella. J Willey, S Chiester (eds). 1989; pp 73-84
17. Horwitz M: Formation of a novel phagosome by the legionnaires' disease bacterium in human monocytes. *J Exp Med* 1983; 158: 1319-1331
18. Weekers H, Engelberts M, Vogels D: Bacteriolytic activities of the freeliving soil amoeba, *A. castellanii* and *Hartmanella vermiformis*. *Antonie-Van-Leeuwenhoek* 1995; 68(3); 237-243
19. Barker J, Scaife H, Brown R: Intraphagocytic grown induces an antibiotic resistant phenotype of *L. pneumophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995; 39(12): 2684-2688
20. Cirillo D, Falkow S, Tompkins S: Growth of legionella in *Acanthamoeba* enhances invasion of legionella. *Infection and Immunity* 1994; 62(8): 3254-3261
21. Barer M, Gribbon L, Hearwood C, Nwoguh C: The viable but non-culturable hypothesis and medical bacteriology: *Rev Med Microb* 1993; 4: 183-191
22. Hay J, Seal D, Billcliffe B, Freer J: Non-culturable *L. pneumophila* associated with *A. castellanii*: Detection of the bacterium using DNA amplification and hybridization. *J Appl Bact* 1995; 78: 61-65
23. Kielian M: Assay of phagosome-lysosome fusion. *Methods in Enzymology* 1986; 132: 257-262
24. Ishibashi Y, Yamashita T: Effect of phagocytosis stimulating factor on the phagocytic process of polymorphonuclear neutrophils. *Infection and Immunity* 1982; 38(3): 825-833

